

# メチオニンアデノシルトランスフェラーゼ<sup>2a</sup>を介したB細胞活性化抑制機構と全身性エリテマトーデス治療への応用

著者	石井 悠翔
号	89
学位授与機関	Tohoku University
学位授与番号	医博第3968号
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10097/00129381">http://hdl.handle.net/10097/00129381</a>

氏 名	いしい ゆうしょう 石井 悠翔		
学 位 の 種 類	博士 (医学)		
学位授与年月日	2020 年 3 月 25 日		
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 1 項		
研 究 科 専 攻	東北大学大学院医学系研究科 (博士課程) 医科学専攻		
学 位 論 文 題 目	メチオニンアデノシルトランスフェラーゼ 2a を介した B 細胞 活性化抑制機構と全身性エリテマトーデス治療への応用		
論文審査委員	主査 教授 張替 秀郎	教授 五十嵐 和彦	
	教授 小笠原 康悦	教授 高井 俊行	

## 論 文 内 容 要 旨

必須アミノ酸であるメチオニンの代謝経路は、遺伝子発現制御に働く転写後修飾の一つであるメチル化反応に深く関与している。メチル化に必要なメチル基の主な供給源は S-adenosylmethionine (SAM) であり、SAM はメチオニンと Adenosine triphosphate (ATP) から Methionine adenosyltransferase 2a (Mat2a)によって合成される。細胞分裂の際には、メチル化による遺伝子発現情報を維持する必要があり、新たに生まれる細胞のためのメチル基が必要となる。これに一致して、メチル基の合成に重要な Mat2a のプロモーター領域には、B 細胞受容体の下流で細胞増殖や活性化の際に上昇する NF $\kappa$ B や AP-1 といった転写因子の結合配列が存在する。つまり、細胞分裂刺激が入るとメチル基を補うために Mat2a の発現が上昇して SAM が合成されることが示唆される。また、B 細胞分化や活性化において重要な遺伝子の発現もエピジェネティック修飾により制御されている。V(D)J 遺伝子組み換えやイムノグロブリンクラススイッチには、H3 lysine4 (H3K4)のメチル化修飾が重要であることが報告されており、これらは B 細胞の分化や活性化に重要である。これらのことから、Mat2a は B 細胞分化、活性化で重要と考えられるが、その詳細は明らかでない。B 細胞での遺伝子発現制御異常は免疫寛容の破綻につながる。B 細胞異常が病態の一つと考えられている全身性エリテマトーデス (SLE) は難治性の全身性自己免疫疾患である。腎炎は免疫複合体沈着や細胞浸潤により起きると考えられ、約 50%に合併し、予後不良因子の一つである。病態形成において、遺伝要因だけでなく、環境要因を反映するエピジェネティック修飾が関与していると考えられている。SLE 患者において、健常人と比較して、メチオニン代謝物やヒストンメチル化が変化していると報告されているが、未だ疾患発症の原因や疾患活動性との関連は明らかではない。これらのことから、B 細胞における Mat2a の役割と SLE の病態への影響を明らかにし、SLE に対する新規治療薬への応用を目指して本研究を行った。

まず、野生型 C57BL/6 マウスに Mat 阻害剤である cycloleucine (CLEU)を投与して、造血細胞に対する影響を確認したところ、脾臓と胸腺が著明に縮小した。さらに、成熟リンパ球が骨髄で増加し、二次リンパ組織では減少した。

次に、二次リンパ組織での B 細胞の減少の原因を検証するために、私はマウス B 細胞リンパ腫由来の細胞株 BAL17 に CLEU を添加して、細胞増殖への影響と B 細胞受容体刺激との相互作用を検討した。Mat2a 阻害により、B 細胞株は Cell cycle arrest やアポトーシスへ誘導された。

さらに、生体内での B 細胞分画への影響を明らかにするために、野生型 C57BL/6 マウスに CLEU を投与して、その影響を検討した。骨髄で分化する段階である Pro B 細胞から Immature B 細胞と脾臓の分画は減少したが、唯一 recirculating している骨髄の Mature B 細胞は増加した。Cell cycle 解析の結果で骨髄 Mature B 細胞の細胞分裂がほぼ起きていないことから、Mat 阻害により生体内

でのリンパ球の遊走が影響を受けている可能性が高いことが示唆された。

免疫応答刺激に対する影響を確認するため、マウス脾臓 B 細胞にクラススイッチや形質細胞分化を誘導する活性化刺激を与えて、B 細胞の活性化に対する影響を検討した。その結果、Mat2a 活性が B 細胞内で阻害されると、イムノグロブリンサブクラスの Switch 領域で H3K4me3 修飾が抑制され、Germline transcript の発現が減少することで、クラススイッチが抑制されることが明らかになった。

最後に、Mat2a が B 細胞の恒常性維持に働いており、細胞増殖や活性化が抑制されたことから、B 細胞の異常活性化による自己抗体産生が病態の一因である SLE において、過剰に活性化した B 細胞を正常レベルにまで抑制することができれば、その病態を制御できると考えた。Mat 阻害の SLE に対する治療効果を見るために、ループスモデルマウスである MRL/lpr マウスに CLEU を投与したところ、腎炎、脾腫、リンパ節腫大、抗 ds DNA 抗体価の改善を認めた。

Mat2a 阻害剤は、SAM 合成を阻害し、H3K4me3 修飾を低下させることで、B 細胞活性化刺激により誘導される遺伝子の発現を減弱させ、B 細胞の活性化を抑制し、SLE の病態を改善させた。これらのことから Mat2a 阻害は新たな SLE に対する新たな治療標的になりうると考えられた。

## 審 査 結 果 の 要 旨

博士論文題目 メチオニンアデノシルトランスフェラーゼ 2a を介した B 細胞活性化抑制機構と全身性エリテマトーデス治療への応用

所属専攻・分野名 医科学専攻・血液・免疫病学分野

学籍番号 B5MD5009 氏名 石井悠翔

遺伝子発現を制御するエピジェネティック修飾の一つであるメチル化に必要なメチル基の主な供給源は、S-adenosylmethionine (SAM) であり、Methionine adenosyltransferase 2a (Mat2a) はその合成酵素である。すなわち、必須アミノ酸であるメチオニンの代謝経路は遺伝子発現制御に働くメチル化反応に深く関与しており、特に Mat2a はメチル化反応に非常に重要であるといえる。遺伝子発現パターンは細胞や細胞の活性化状態など様々な要因によって異なる。細胞分裂の際には、この遺伝子発現情報を保つために、メチル化を維持する必要がある、新たに生まれる細胞の分のメチル基が必要となる。メチル基の合成に重要な Mat2a のプロモーター領域には NF $\kappa$ B や AP-1 といった B 細胞受容体の下流で発現する転写因子の結合配列が存在することから、Mat2a や SAM は B 細胞分化、活性化で重要な働きをしていると考えられるが、その詳細は明らかでない。

B 細胞分化や活性化において重要な遺伝子の発現もエピジェネティック修飾により制御されており、その異常は自己抗体産生をはじめとした自己免疫疾患の発症にもつながることが推測される。全身性エリテマトーデス (SLE) は難治性の全身性自己免疫疾患であるが、主要な臓器障害であるループス腎炎は免疫複合体沈着や細胞浸潤により起きると考えられており、約 50%に合併し予後不良因子の一つである。その病態形成において、遺伝要因だけでなく、環境要因を反映するエピジェネティック修飾が関与していると考えられている。SLE 患者において、健常人と比較して、メチオニン代謝物やヒストンメチル化が変化していると報告されているが、未だ疾患発症の原因や疾患活動性との関連は明らかではない。そこで、本研究では SLE の病態や病因に強く関与する B 細胞における Mat2a の役割を明らかにすることを目的とした。

培養細胞やマウスを用いて実験を行ったところ、Mat2a が B 細胞で、細胞周期、アポトーシス、クラススイッチや B 細胞受容体刺激を制御していることが明らかとなった。さらに、Mat2a 阻害により生体内でのリンパ球の遊走も影響を受けることが示唆された。さらに、Mat2a 阻害の SLE に対する治療効果を見るために、SLE モデルマウスである MRL/lpr マウスに Mat2a 阻害剤である Cycloleucine (CLEU) を投与したところ、腎炎、脾腫、リンパ節腫大、抗 ds DNA 抗体価の改善を認めた。これらの結果から、Mat2a 標的は SLE 治療の新たな治療になりうると考えられた。

本研究は難治性自己免疫疾患である SLE の新たな治療法の確立につながる臨床的に極めて重要な研究である。

よって、本論文は博士（医学）の学位論文として合格と認める。